

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

05115381

METHOD FOR TREATING CHLORINATED ETHYLENE BY MICROBIOLOGICAL METHOD

PUB. NO.: 08-070881 [J P 8070881 A]
PUBLISHED: March 19, 1996 (19960319)
INVENTOR(s): SAEKI HISAFUMI
MIURA AKIRA
APPLICANT(s): JAPAN ENERGY CORP [330259] (A Japanese Company or
Corporation), JP (Japan)
APPL. NO.: 07-191043 [JP 95191043]
FILED: July 05, 1995 (19950705)
INTL CLASS: [6] C12P-017/02; C02F-003/34; C12N-015/09; C12P-017/02;
C12R-001/365; C12N-015/09; C12R-001/365
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1
(SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.2 (POLLUTION CONTROL
-- Waste Water Treatment)
JAPIO KEYWORD: R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)

ABSTRACT

PURPOSE: To efficiently treat a mono to tri-chlorinated ethylene by a
microbiological oxidation method.

CONSTITUTION: A microorganism having an alkene monooxygenase enzyme-producing ability or a microorganism capable of being grown in a medium containing only an alkene as a carbon source is grown in a culture medium containing a mono to tri-chlorinated ethylene, thus microbiologically oxidizing the mono to tri-chlorinated ethylene with the microorganism to convert into the corresponding epoxide.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-70881

(43)公開日 平成8年(1996)3月19日

(51)Int.Cl'

C 12 P 17/02

C 02 F 9/34

C 12 N 15/09

類別記号 序内整理番号

7432-4B

ZAB Z

ZNA

P I

技術表示箇所

9281-4B

C 12 N 15/ 00

ZNA A

(C 12 N 15/ 00

ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数 7 FD (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平7-191043

(71)出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー

京都府京都市虎ノ門二丁目10番1号

(22)出願日

平成7年(1995)7月5日

(72)発明者 佐伯 尚史

埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式

会社ジャパンエナジー内

(31)優先権主張番号 特願平6-179889

(72)発明者 三浦 彰

埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式

会社ジャパンエナジー内

(32)優先日 平6(1994)7月8日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(74)代理人 弁理士 並川 啓志

(54)【発明の名称】 微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法

(57)【要約】

【構成】 アルケンモノオキシゲナーーゼ酵素生産能を有する微生物、或は、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を、置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で生育せしめ、当該微生物により置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【効果】 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを微生物酸化により、効率良く処理することができる。

(2)

特開平8-70881

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することを特徴とする微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項2】 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することを特徴とする微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項3】 前記の微生物が、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAを含有するプラスミドベクターを導入し形質転換してなる該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物であることを特徴とする請求項1に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項4】 前記の微生物が、Nocardia 属(ノカルディア属)、Rhodococcus 属(ロドコッカス属)、Xanthobacter 属(サンボバクター属)及びMycobacterium 属(ミコバクテリウム属)よりなる群から選択される属に分類される微生物であることを特徴とする請求項1、2又は3に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項5】 前記の微生物が、Nocardia corallina(ノカルディア コラリーナ)B-276株(FERM BP-5124; ATCC 31338)であることを特徴とする請求項1、2又は4に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項6】 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAが、Nocardia corallina(ノカルディア コラリーナ)B-276株(FERM BP-5124; ATCC 31338)由来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAであることを特徴とする請求項3又は4に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項7】 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物が、Escherichia coli(イーコリ)に分類される形質転換微生物であることを特徴とする請求項3又は6に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物学的方法により塩素置換エチレンを処理する方法に関する。特にトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを添加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産

能を有する微生物或いは炭素源としてアルケンのみを含有する培地内で生育可能な微生物を生育させ、当該微生物を作用させて塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して分解処理する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ハロゲン置換脂肪族炭化水素、特に、炭素数1又は2の塩素置換化合物は、油脂などの有機物をよく溶解するので洗浄用溶剤として広範に使用されてきた。例えば、塩素置換エチレンであるトリクロロエチレンは、難水溶性であり且つ揮発性が高い特質を利用して、ドライクリーニング用溶剤、電子機械工業や半導体工業での脱脂用洗浄剤として主に使用されてきた溶剤である。トリクロロエチレンは、クロロホルムと同様に中枢神経系に対し抑制作用、麻酔作用を持ち、更には突然変異(奇形)誘導性或は発癌性を有することが報告されている。その毒性故、回収処理がなされている。不幸にして排水に混入し漏洩したトリクロロエチレンは、自然界では分解され難く又難水溶性のため、土壤や地下水脈に蓄積し汚染を起こしてしまっている。これら環境汚染したトリクロロエチレンは、揚水した地下水を曝気し、大気に揮散し回収する方法、活性炭により吸着除去する方法、減圧下で土壤ガスを吸着除去する方法などの物理的な方法により回収されている。また、回収されたトリクロロエチレンは、焼却や触媒を用いた光化学的な手段で分解処理されている。

【0003】 更には、土壤に生息する嫌気性細菌の或るものは、トリクロロエチレンからより高い突然変異(奇形)誘導性或は発癌性を示す塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンを作ることが見い出されるに至り(E.J.Bouwer and P.L.McCarthy, Appl. Environ. Microbiol., 45, 1286 (1983), T.M.Vogel, C.S.Cridle, and P.L.McCarthy, Environ. Sci. Technol., 21, 722 (1987), Appl. Environ. Microbiol., 49, 1080 (1985)などを参照)、環境汚染したトリクロロエチレンの迅速な処理が益々必要となっている。近年、地下水脈に蓄積汚染し、広い範囲に比較的の低濃度で拡散するトリクロロエチレンを処理する目的で、微生物を用いた分解除去に期待が寄せられている。

【0004】 既に、トリクロロエチレンから塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンを作る可能性がある嫌気性細菌以外に、好気性の細菌のうちにも、ハロゲン置換脂肪族炭化水素を分解する能力を有する細菌が存在することが報告されている。特に、好気性の微生物によるトリクロロエチレンの処理方法には、例えば、トルエン資化性菌(トルエンジオキシゲナーゼ)(G.J.Zylstra, L.P.Wackett, and D.T.Gibson, Appl. Environ. Microbiol., 55, 3162 (1989)などを参照)、トルエン資化性菌(トルエンモノオキシゲナーゼ)(R.B.Winter, K-M.Yen, and B.D.Ensley, Bio/Technol., 7, 282 (1989)などを参照)、メタン資化性菌(メタンモノオキシゲ

(3)

特開平8-70881

3

ナーゼ) (R.Oldenhuis, R.L.J.M.Vink, D.B.Janssen, and B.Wittholt, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2819 (1989)などを参照)、アンモニア資化性菌(アンモニアモノオキシゲナーゼ) (T.Vannelli, M.Logan, D.M.Arciero, and A.B.Hooper, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1169 (1990)などを参照)など、アンモニア、メタン或はメチル基を酸化する酵素を生産する微生物。即ち二重結合を含まない原子団を酸化する酵素を生産する微生物を用いて、トリクロロエチレンを処理する方法が報告されている。しかしながら、これらの水素原子をヒドロキシ基に酸化転換する酵素以外の炭化水素酸化酵素を利用するトリクロロエチレンの微生物的手法による処理方法は、これまでのところ確立されていない。特に、高い効率でトリクロロエチレンを処理するに適する、新たなトリクロロエチレンの微生物的手法による処理方法の開発が望まれている。

【0005】加えて、トリクロロエチレンのみでなく、嫌気性細菌の作用によりトリクロロエチレンから変換される、塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンなどの塩素置換エチレンをも同時に処理することができる。塩素置換エチレンの微生物的手法による処理方法の開発が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、トリクロロエチレン、塩化ビニル(クロロエチレン)、ジクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを微生物的手法による新規な処理方法を提供することである。即ち、本発明の目的は、高い効率でトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを分解処理するに適する、微生物的手法による塩素置換エチレンの新たな処理方法を提供することにある。特に、芳香族炭化水素を酸化する酵素に換えて、非芳香族の炭化水素を酸化する酵素による酸化過程を利用する、即ち非芳香族の炭化水素を酸化する酵素を生産する微生物又は非芳香族の炭化水素を資化する微生物を利用し、効率良く塩素置換エチレンを処理することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究したところ、非芳香族の炭化水素であるアルケンを資化する生物活性を有する微生物により、或いはアルケンを酸化し対応するエポキシドに変換する酵素であるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物により、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンが微生物的に酸化され、トリクロロエチレンオキシドなど、対応するエポキシドに転換されることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、下記の(1)～(7)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法である。

(1) 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添

4

加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(2) 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(3) 前記の微生物が、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAを含有するプラスミドベクターを導入し形質転換してなる該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物であることを特徴とする前記

(1)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(4) 前記の微生物が、*Nocardioides* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(ザンボバクター属)及び*Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)よりなる群から選択される属に分類される微生物であることを特徴とする前記(1)～(3)の何れかに記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(5) 前記の微生物が、*Nocardioides corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)であることを特徴とする前記(1)、(2)又は(4)の何れかに記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(6) 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAが、*Nocardioides corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)由来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAであることを特徴とする前記(3)又は(4)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(7) 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物が、*Escherichia coli* (イー・コリ)に分類される形質転換微生物であることを特徴とする前記

(3)又は(6)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法で分解処理される、置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンとは、具体的には、トリクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、*cis*-1,2-ジクロロエチレン、*trans*-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)をさす。また、本発明の方法により該塩素置換エチレンから転換され生成するエポキシドは、培地に多量に含まれる水により、

(4)

特開平8-70881

5

エポキシ環が水付加開環して対応する塩素置換エタンシオールに速やかに変換される。最終的には、該塩素置換エタンシオールは、更に代謝を受けて微生物学的な分解を受ける、或いは化学的に置換する塩素原子の水酸基への変換を受け、分解される。なお、該塩素置換エチレンから生成される対応のエポキシドが、更に酸性或はアルカリ性条件の下で、水中において化学的に分解される過程は、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(3), 486-489 (1992)などの刊行物に記載されている。

【0010】本発明において利用する微生物、即ち、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物は、土壤中から採取し、プロピレンを唯一の炭素源として含有する培地を用いて生育させることにより、分離することができる。特には、プロピレンからプロベンオキシドを経由して分解する微生物が好適に用いることができる。具体的には、プロピレンからプロベンオキシドを生産する能力を有する微生物として、既に報告されている *Nocardia* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(サンソバクター属)及び *Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)からなる群に分類される微生物は、プロピレンからプロベンオキシドへの酸化能が高く、好適な微生物である。これらの菌として、次の文献、C. G. van Ginkel, H. G. J. Welten and J. A. M. de Bont, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2903 (1987)に記載される菌を例示することができる。上記する炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能であり、*Nocardia* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(サンソバクター属)及び *Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)からなる群に分類される微生物の内、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを対応するエポキシドに変換する能力の高いものは、一層好適な微生物である。

【0011】また、本発明に用いるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物は、アルケン代謝に関わる、初期酸化酵素のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を產生する微生物である。即ち、アルケンから対応するエポキシドに変換するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を產生する微生物であり、例えば、アルケンとしてプロピレンを用い、対応するエポキシドを産生する微生物として土壤中から分離することができる。好適な微生物として、*Nocardia* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(サンソバクター属)及び *Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)からなる群に分類され、且つ末端に炭素-炭素二重結合を有するアルケンを対応するエポキシドに変換する能力を有する菌を挙げることができ、具体的には、文献、C. G. van Ginkel, H. G. J. Welten and J. A. M. de Bont, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2903 (1987)

6

に記載される菌を例示できる。更には、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)に属する微生物のうち、好適な種として、*Rhodococcus rhodochrous* を、具体的な菌株として、American Type Culture Collection に、受託番号 ATCC 29675, ATCC 29670, ATCC 29672 をそれぞれ付与され、寄託されている菌株を例示することができる(米国特許5 380 654号、米国特許5 376539号特許公報などを参照)。或は、*Rhodococcus* sp. ATCC 29673, *Rhodococcus* sp. ATCC 29674などの菌株を例示することができる(米国特許5 380 654号、米国特許5 376539号特許公報などを参照)。*Xanthobacter* 属(サンソバクター属)に属する菌として、*Xanthobacter strain Py2* 株など(*Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3038 (1992)を参照)、*Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)に属する菌として、*Mycobacterium strain L1* 株(*Biotechnol. Lett.*, 7, 383-388 (1985)、或は *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2555-2560 (1991)を参照)、*Mycobacterium rhodochrous* NCIB 703 株(米国特許4 956 284号特許公報を参照)などをも例示することができる。又、天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子DNAを公知の遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物も、該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素を產生するので好適に用いることができる。特には、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が高く維持される微生物は、一層好適な微生物である。

【0012】更には、本発明において特に好適な菌として、本発明者らが先の特許出願(特願平5-105171号の明細書、即ち特開平6-292571号公報を参照)に開示する *Nocardia corallina* (ノカルディアコラリーナ) B-276 株(FERM BP-5124; ATCC 31338)を挙げができる。又、当該菌株、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株(FERM BP-5124; ATCC 31338)の产生するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子DNA, amoABCD遺伝子を大腸菌由来のプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターにより形質転換してなる大腸菌、即ち該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する大腸菌形質転換株、例えば、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pOBB-1) 株(FERM BP-4250)なども、特に好適な菌として挙げができる。なお、前記する微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株(FERM BP-5124; ATCC 31338)は受託番号 FERM BP-5124 が付与され、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pOBB-1) 株(FERM BP-4250)は受託番号 FERM BP-4250 が付与され、ともに通産省工業

(5)

特開平8-70881

7

技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また、微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、American Type Culture Collection に、受託番号 ATCC 31338 を付与され、寄託されている。なお、微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、従来、受託番号 P-4094 のもとに国内寄託されていたが、国際寄託に移管され、新たに通産省工業技術院生命工学工業技術研究所より受託番号 FERM BP-5124 を付与されている。この二種の微生物は、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が高く維持され、従って、置換する塩素数 1～3 の塩素置換エチレンを対応するエポキシドに変換する能力が高く保たれるので、特に好適な微生物である。加えて、*Nocardia* 属 (ノカルディア属) 及び *Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属) に属し、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する菌は、一般に、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が高く維持されるので、好適な微生物である。

[0013] 加えて、天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を公知の遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物は、前記する宿主微生物が大腸菌であるものに限らず、*Nocardia* 属 (ノカルディア属) や *Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属)などのノカルディフィルム細菌由来のプラスミドを利用し、外来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を組み込んでなるプラスミドベクターを導入してなる。宿主微生物がノカルディフィルム細菌である該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する形質転換菌株も好適に利用できる。なお、前記するノカルディフィルム細菌或はコリネフィルム細菌由来のプラスミドと大腸菌由来のプラスミドから、両者の菌間でのシャトルベクター-プラスミドを調製し、これにアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を組み込み発現ベクター (環状プラスミド) を構築する。係るアルケンモノオキシゲナーゼ酵素発現ベクターは、例えば、宿主微生物であるノカルディフィルム細菌の細胞をプロトプラスト或はスフェロプラストにして、環状プラスミドをポリエチレン

20

グリコールと共に存させることとして移入する方法 (J. Bacteriol., 170, 638-645 (1988)などを参照)、または宿主微生物の細胞を対数増殖中期まで培養し、高電圧の電気パルスを与えて移入する方法 (Appl. Environ. Microbiol., 56, 2818-2825 (1990)などを参照) 等の公知の技術を適用し、該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する形質転換菌株を調製することができる。

[0015] 上記する天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を用いる場合、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素として *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) の產生するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素が好適に用いることができる。この酵素は、アルケンに酸素を付加しエポキシドを形成するエポキシダーゼのスマートサブユニットとラージサブユニットにそれぞれ当たる amoA と amoC、前記するエポキシダーゼに捕酵素 NADH から電子を伝達するレダクターゼ (還元酵素) に当たる amoD 及びそれらを複合酵素系に構成するカップリングタンパク質と称される amoB の 4 つの蛋白質部分からなっている。

[0016] この amoA、amoB、amoC 及び amoD は、その遺伝子 DNA は配列番号 1 に示す amoABCD 遺伝子にクラスターとしてそれぞれのアミノ酸配列が連続してコードされている。なお、アミノ酸配列は配列番号 1 に示す amoABCD 遺伝子のコドンに対応して示されている (特願平 5-105171 号の明細書、即ち特開平 6-292571 号公報を参照)。更に、この好適な amoABCD 遺伝子を市販されている大腸菌由来のプラスミド pUC18 (宝酒造株式会社より購入) に組み込んでなるプラスミドベクター - pDBB1 (図 1 を参照) は、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pDBB-1) 株 (FERM BP-4250) に保持されている。前記プラスミドベクター - pDBB1 を宿主の大腸菌の担々の菌株に導入してなる形質転換菌株は、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pDBB-1) 株 (FERM BP-4250) と同様に好適なアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物として用いることができる。

[0017] 本発明においては、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物、或はアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物の何れかを選択し、トリクロロエチレンなど、置換する塩素数 1～3 の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、当該微生物を生育せしめ、該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して処理するに際し、該微生物の生育は通気条件又は好気条件下で行いことが好ましい。即ち、これらの微生物の産出するアルケンモノオキ

50

8

(6)

特開平8-70881

9

シゲナーゼ酵素、或はアルケン代謝に関わる酸化酵素は、ともに通気条件又は好気条件下においてその酵素活性を高く維持することができる。

【0018】本発明における微生物の生育には、例えば、(a) 該微生物を予め培養増殖して得られる菌体を、塩素置換エチレンを添加してなる培地で好気条件下に生育する方法、(b) 該微生物を、その他の炭素源、窒素源、無機塩類、更には必要に応じて成長促進物質を含有せしめた栄養培地に塩素置換エチレンを添加してなる培地で通気条件又は好気条件下に培養生育する方法を好適に適用することができる。なお、微生物の生育は、培地のpHをpH 5~9、好ましくはpH 6~8の範囲に、温度を20~50°C、好ましくは25~45°Cの範囲に保ちつつ、1~6日間行なう。更には、生育中、当該微生物の菌体増殖に利する炭素源、窒素源、更にはその他の成分を適宜添加することにより、菌体とトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンとの反応の活性を維持し或いは高めることができる。

【0019】上記の(a) 該微生物を予め培養増殖する方法においては、培養増殖のための培地には、まず炭素源として糖質例えばグルコース、シュークロース、醸造、でん粉加水分解物、セルロース加水分解物及び、炭化水素例えはブロビレン、エチレン、ブタジエンなどの菌体増殖作用の高いものを用い、窒素源として塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素、アンモニア水、アミノ酸及びその他の資化性有機窒素化合物など、無機塩類としてリン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、塩化カルシウム、塩化マンガンなど、更には必要に応じてビタミン類、酵母エキス、コーンスティーブリカーやの如き成長促進物質をも添加した培地を用いる。この培養増殖のための培地に該微生物の菌種を接種し、好気的条件下で培養して菌体を増殖させる。このようにして得られた菌体培養物に直接か、又は該培養物から分離した菌体の懸濁液もしくは菌体を固定化したものに、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを添加してなる培地を加える。

【0020】他方、上記の(b) 該微生物を、栄養培地に塩素置換エチレンを添加してなる培地で通気条件又は好気条件下に培養生育する方法においては、栄養培地として前記(a) の方法で用いる培養増殖のための培地を用いて、該微生物の菌種を接種培養する際に、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを培地に供給して酸化反応をさせる。

【0021】何れの生育方法においても、塩素置換エチレンを培地に添加する方法は、予め微生物を生育する開始時に所定量を全量を加えても良いし、生育の時間経過に従い、塩素置換エチレンを回分方式又は連続方式で適宜加えても良い。添加を回分方式にて行う際は、間歇的に供給することができる。更には、トリクロロエチレン

などの塩素置換エチレンは液体、或は水に溶解又は拡散する混合物として添加するのみでなく、該塩素置換エチレンの蒸気を含む空気を培地に吹き込むなどの手段を探り、気相より培地に添加してもよい。好ましくは、培地に添加する塩素置換エチレンは、培地中の該塩素置換エチレン濃度が1 mMを超えない範囲に保つ事を選ぶとよい。更には、これら菌体反応は、温度30~45°Cの範囲、特には、35°C付近(35±5°C)で行うのが好ましい。

【0022】なお、上記する本発明に用いるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物、或は炭素源としてアルケンのみを含有する培地内で生育可能な微生物は、トリクロロエチレンのみでなく、少なくとも1つの水素原子を有する塩素置換エチレン、更には少なくとも1つの水素原子を有するフッ素を除くハロゲン置換エチレンを微生物学的に酸化して分解することができる。そのため、好気条件下で当該微生物を汚染された地下水中含まれるトリクロロエチレンを処理に利用する際には、土壤に生息する嫌気性細菌がトリクロロエチレンから生成する塩化ビニル(クロロエチレン)やシクロロエチレンが存在していても、同時に処理することができる。また、塩化ビニルやジクロロエチレンのより高い毒性のため、当該微生物の死滅或は生理活性の低下が起こることもなく、長期又は連続的な汚染された地下水中含まれるトリクロロエチレンの処理に適する。

【0023】更には、本発明に利用される酵素反応又は菌体反応は、置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンのみでなく、一般に、塩素、臭素又はヨウ素が1~3置換するハロゲン置換エチレンに対しても有効である。即ち、それらハロゲン置換エチレンを対応するエポキシドに転換することができ、微生物学的方法による該ハロゲン置換エチレンの処理方法として利用できる。以下実施例により本発明を更に具体的に説明する。

【0024】

【実施例1】*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)の菌体3白金耳を、NBG培地(オキソイド社製ラブレンコバウダ-10g、バクテリオロジカルペプトン 10g、グルコース 10g 及び塩化ナトリウム 5gに水を加え1:1とし、1N-苛性ソーダ水溶液を加えて pH 7.5 に調製した後、オートクレーブ中で120°C、15分加熱殺菌した液体培地)100 mlを入れた 500 ml容の坂口フラスコに接種し、30°Cで96 時間振盪し、予め菌体を培養増殖した。

【0025】この予め培養増殖により得られた培養液を遠心分離し、集菌した。次に、集菌した菌体を、50 mlの培地(K_2HPO_4 1.74g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 脱イオン水 1l, pH 8.0 に調製)に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0026】フラスコに入れた前記菌懸濁液に、更に2.5 mlの10% グルコース溶液とトリクロロエチレン(最

50

(7)

特開平8-70881

11

終濃度 1 mM) を添加し密閉後、振盪しながら 30 °Cで12 時間育成し、トリクロロエチレンと反応させた。その後、培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定により、この培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度(I_1)を決定した。

【0027】他方、参照例として、同じ容量のフラスコに入れた菌体を含まない 50 ml の培地 (K_2HPO_4 1.74g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に、2.5 ml の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン(最終濃度 1 mM) を添加し密閉後、30 °Cで12 時間振盪した。この参照例の培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定によりこの培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度(I_1)を決定した。この参照例のシグナル強度(I_1)は、当初のトリクロロエチレン(最終濃度 1 mM) を添加した培地において測定されるトリクロロエチレンのガスクロマトグラフィーのシグナル強度(I_0)の 9.5 % 以上であった。

【0028】前記シグナル強度(I_1)は、参照例のシグナル強度(I_0)の約 2 % であった。即ち、当該微生物を生育することで、培地に残留するトリクロロエチレンの培地濃度を約 2 % とすることができ、約 9.8 % のトリクロロエチレンが処理分解されたことが判る。なお、上記する処理において、トリクロロエチレンは、先ずトリクロロエチレンオキシドに転換されている。また、該 *Nocardiocorallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、グルコースを炭素源として添加して予め培養し、且つグルコースを炭素源として添加して菌体反応を行わせる際にも、トリクロロエチレンの処理能力が高いことが判る。

【0029】

【実施例 2】 *Nocardiocorallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 由来のアルケンモノオキシゲナーゼ遺伝子で形質転換した *E. coli* (大腸菌) JM109 (pD88-1) 株 (FERM-BP4250) の菌体 1 白金耳を、50 μg/ml のアンビシリン含有 LB 培地 (バクトラートリプトン 10g, バクトイーストエキス 5 g 及び塩化ナトリウム NaCl 10g に脱イオン水を加え 1 l とし、1N-苛性ソーダ水溶液を加え pH 7.2 に調製した後、オートクレーブ中で 120 °C, 15 分加熱殺菌した液体培地) 1.5 ml に接種し、37 °Cで一晩(約 14 時間) 予め菌体を培養増殖した。得られた培養物を、再度 50 μg/ml のアンビシリン含有 LB 培地 100 ml に接種し、37 °Cで 2 時間培養した。この液に最終濃度が 1 mM となるように IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、更に 37 °Cで 5 時間振盪培養した。この一連の培養により得られた培養液の 10 ml を遠心分離により集菌し、2 ml の培地 (K_2HPO_4 1.74 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0030】 フラスコに入れた前記菌懸濁液に、100 μl の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン(最終

12

濃度 1 mM) を添加し密閉後、振盪しながら 30 °Cで 12 時間、トリクロロエチレンと反応させた。その後、培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定により、この培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度(I_1)を決定した。

【0031】他方、参照例として、同じ容量のフラスコに入れた菌体を含まない 2 ml の培地 (K_2HPO_4 1.74g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に、100 μl の 10 % グルコース溶液と

トリクロロエチレン(最終濃度 1 mM) を添加し密閉後、30 °Cで 12 時間振盪した。この参照例の培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定によりこの培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度(I_1)を決定した。この参照のシグナル強度(I_1)は、当初のトリクロロエチレン(最終濃度 1 mM) を添加した培地において測定されるトリクロロエチレンのガスクロマトグラフィーのシグナル強度(I_0)の 9.5 % 以上であった。

【0032】前記シグナル強度(I_1)は、参照例のシグナル強度(I_0)の約 8.3 % であった。即ち、当該微生物を生

育することで、培地に残留するトリクロロエチレンの培地濃度を約 8.3 % とすることができ、約 1.7 % のトリクロロエチレンが処理分解されたことが判る。なお、上記する処理においても、トリクロロエチレンは、先ずトリクロロエチレンオキシドに転換されている。また、グルコースを炭素源として添加する際にも、該 *E. coli* (大腸菌) JM109 (pD88-1) 株 (FERM-BP4250) は、トリクロロエチレンの処理能力が高いことが判る。

【0033】

【実施例 3】 *Nocardiocorallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) によるトリクロロエチレンの微生物学的な酸化処理速度に対する、トリクロロエチレン添加濃度の影響を下記の方法で検証した。

【0034】 上記の実施例 1 に記載の培養増殖法に従い、*Nocardiocorallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) を、予め菌体を培養増殖した。次に、集菌した菌体を、50 ml の培地 (K_2HPO_4 1.74g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0035】 該菌懸濁液 2 ml を、容量 17 ml のフラスコに入れ、更に、エネルギー源として、100 μl の 10 % グルコース溶液を加え、所定量のトリクロロエチレンを添加し密閉後、振盪しながら 35 °Cで 5 時間、トリクロロエチレンと反応させた。なお、この反応時、菌濃度は、2.44 g/l であった。この間、1 時間経過ごとに、密閉されたフラスコの気相より、1 ml の気体をサンプリングし、その中に残存するトリクロロエチレン気相濃度をガスクロマトグラフィー法 (カラム: Porapak Q) により分析した。このトリクロロエチレン気相濃度

(8)

13

の測定値を基に、液相に残存するトリクロロエチレン濃度に換算を行った。

【0036】当初に添加するトリクロロエチレンの量（液相濃度初期値）を種々に採り、該微生物を作らせた際、液相に残存するトリクロロエチレン濃度の経時的变化を比較した一例を、図2に示す。また、液相のトリクロロエチレン濃度の減少率を、トリクロロエチレンの液相濃度初期値に対してプロットした結果の一例を、図3に示す。これらの結果に示されるように、該 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) の処理速度は、添加するトリクロロエチレンの液相濃度初期値にはほぼ比例しており、少なくともトリクロロエチレンの液相濃度初期値 90 mg/lまでの範囲では、明確な阻害は見いだされていない。図3に示す結果を基に、基質トリクロロエチレンのこの酵素反応に対する K_m 値を算出したところ、 $K_m = 90.4 \text{ mg/l}$ (0.678 mM) の値が得られた。

【0037】以上の結果より、当該菌 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、高いトリクロロエチレン濃度においても、その酵素反応は阻害を受けず、高い処理能力を保つと判断される。

【0038】加えて、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) によるトリクロロエチレンの微生物学的な酸化処理速度に対する、温度の影響を検証した。処理速度に換えて、菌濃度を、8.0 g/lに採り、トリクロロエチレンの液相濃度初期値を 50.1 mg/lとしたとき、処理開始後60 分間経過した時点で、液相に残存するトリクロロエチレン濃度を初期値に対する比率で表記した値を、酸化処理速度の指標とした。培地温度を種々に選び、一定温度で処理を行った結果を、処理速度(相対値)を培地温度に対してプロットした一例を、図4に示す。培地温度が 35°C付近で、処理速度が極大となることが判った。即ち、30~45°Cの範囲、具体的には、この35°C付近を中心前後5°Cの範囲で処理することが好ましいことが判った。

【0039】

化合物	*	処理速度 (mg/l/h)	使用した菌濃度 (g/l)
cis-1,2-ジクロロエチレン		72.2	4.0
1,1-ジクロロエチレン		14.8	8.0
trans-1,2-ジクロロエチレン		6.5	4.0
トリクロロエチレン		5.5	4.0
テトラクロロエチレン		0	4.0
1,2-ジクロロエタン		0	4.0

【0043】この点からも、本菌体反応は、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素反応により、エポキシドに転換される過程が、その初期反応であることが確認される。更には、テロラクロロエチレン(パークロロエチレン)では酵素反応が起ららず、cis-1,2-ジクロロエチレンで酵

特開平8-70881

14

* 【実施例4】 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) を利用して、トリクロロエチレン以外の塩素置換エチレン、即ち、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)に付いても、酸化処理が行えることを検証するため、下記する条件で処理を試みた。なお、テロラクロロエチレン(パークロロエチレン)と 1,2-ジクロロエタンに付いても、併せて処理を試みた。なお、菌体の培養、及び菌体反応に用いる培地の組成(基質を除く組成)等の条件は、実施例1に従った方法を用いた。

【0040】上記の各基質の添加量は、液相濃度初期値が 20 mg/lを超えない範囲、即ち何れの基質でも菌体反応に対する基質阻害が見いだされないと予測される範囲を選択した。具体的には、トリクロロエチレンの液相濃度初期値が 11.2 mg/lに相当する添加量 100 mg に選んだ。反応時の菌濃度を、4.0 g/l 又は 8.0 g/lに採り、上記の実施例3の手法に準じて、気相中の各基質濃度を経時的に測定し、液相濃度に換算した結果を基に、処理速度を算出した。各基質の残余量の経時的な変化を処理時間に対してプロットし、比較した一例を、図5に示す。

【0041】算出された各基質に対する処理速度と用いた反応時菌濃度を、表1に示す。該 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) を利用して、トリクロロエチレン以外の塩素置換エチレン、即ち、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレンに付いても、処理が行えることが確認された。しかしながら、テロラクロロエチレン(パークロロエチレン)と 1,2-ジクロロエタンに付いては、処理が行えないことも判った。1,2-ジクロロエタンは、炭素-炭素二重結合が存在しないので、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の反応により、エポキシドに変換され得ないものであった。

【0042】

【表1】

素反応が最も効率が高い点を考察すると、炭素-炭素二重結合に残余する水素原子が基質の酵素への付加過程に不可欠であることが判る。このことは、cis-1,2-ジクロロエチレンの処理速度が格段に高く、1,1-ジクロロエチレン(7.4 mg/l/hに相当する)、trans-1,2-ジクロロエチレン(7.4 mg/l/hに相当する)。

(9)

特開平8-70881

15

エチレン(6.5 mg/l/h)、トリクロロエチレン(5.5 mg/l/h)の順で僅かずつ減少していることにも、反映されている。更には、基質の酵素への付加過程で、炭素-炭素二重結合に一つの水素原子と一つの塩素原子が同じ配向に存在する基質では、その立体選択性に本質的な差異が無いため、1,1-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレンの間で、処理速度に顕著な差異が生じていないと理解される。更には、cis-1,2-ジクロロエチレンと同じく、シス位に二つの水素原子が残る塩化ビニル(クロロエチレン)に付いても、該酵素反応が速やかに起こると推察される。なお、塩化ビニル(クロロエチレン)は、発癌性物質であり、常温で気体であるため、上記の方法による評価は困難であるので、処理速度の確認は行わなかった。

【0044】上記の結果から、本発明の処理方法は、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素反応により、エポキシドに転換される過程を利用していることが確認され、該 *Nocardia corallina* (ノカルディアコラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)のみでなく、同様のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を生産する微生物一般も利用できることが判る。加えて、トリクロロエチレンを処理する微生物であるならば、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)をも処理することができる。特に、グルコースを炭素源として培養、菌体反応中に添加する際にも、該 *Nocardia corallina* (ノカルディアコラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)は、トリクロロエチレンのみでなく、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、tr*

* ans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)に対する処理能力が高いことが判る。

【0045】

- 【発明の効果】本発明の方法においては、アルケンを資化する生物活性を有する微生物により、或いはアルケンを酸化し対応するエポキシドに変換する酵素であるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物をトリクロロエチレンなどの置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で生育することにより、該塩素置換エチレンを微生物酸化して、効率良く分解処理することができる。更には、本発明の方法は、トリクロロエチレンなどの置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを極く低濃度に含有する汚泥水、或は蒸散するトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを含有する排気など、大量の媒体中に極く低濃度で分散する塩素置換エチレンを処理する際に、最も合目的な塩素置換エチレンの処理法として利用できる。

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：6379

20 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ノカルディア・コラリーナ B-276 (FERM BP-5

124; ATCC 31338)

910-1935 amo A

1935-2285 amo B

2300-3802 amo C

3805-4830 amo D

GCA TCC CCA CGT CCC GAG CCA CGG CGG CGA TCG ACT TCC CGG TCT 45
 CAT GCA CGA TCC CCA CAG CGC CCT CAC CGA ACT CGC CGT CGT ACT 90
 TTT CGG CTT CTC TGA CAT CGC TAC CCC TTA TAG CTG ATG CCT CCA 135
 CGG TCT CGG CGA ATG CCA ATA TGA CTT CGT CAG ATC GTC GGC GGC 180
 AAG AAC CAT CGC TTC CTT CGC CGA CTT CAC AGG CGC CTC TCC TCG 225
 AGG CGT CGT TCG CGC ATG CGT ACC ACC GTC CAG CGA ACC CGA CGA 270
 GAG CGC CGG ATC CGG CGA CGC CAT CGG CAT GAA CGG CGA CGT GTC 315
 GAG AAT CGA TCA GAC TTG GTG CGC AGA TTC CTG CCC CGT CGG 360

CAG AAC CGG ATG CGC ATC CAC CGG CAC TTT CGT CGC CAT CAG TGG 405
 CGG GTT TCG TGA CGC CCT ATG CGC AGT TTT CGA TCG CGG CGG ACA 450
 CAC AGG CGC CGA CGG ATG ACC AGG TAC CGC ACC AGC CGG CGG ACC 495
 CGG CGG TGG TTT CGT CGA ACA AAT GAC AAC TTG ATC AAC CGA TCG 540
 ATC AGG ACC CGC CGC ACT AAC CGC CGG CGA AGC ATC GAC ATC 585
 AAC ACC ATC CGG ACC GTC CGC CCT TCA CAT CGA CGA CAC CTC CGT 630
 CGA TGT GTG CAT ACC CGA TCC ATC CGG CAA CGG CGG CGA CTC 675
 CGC AGC CGG TCC CGC TAG CGG ATT TCA CGG AAC CTC CGA CGT CGT TGG 720
 CTA CGG AAC GTC TCG TGG ATG ACC CGG CCT CGA TCC TCC ATA GAC 765
 CGG TCC GTG CGC CGA ATG TCC TGG TCA CGG ATG CGA CGG CGT CGT TGG 810
 ATT CCT CTC CGC CGG CGC AMG ACC CGG CGG CGC CGT CGT TCT AAC 855
 ATC CGG CGA CAA CGA AAT CGC AAC CGG ACC CGA AGC ATG GAA CGC 900

(10)

特開平8-70881

17

18

GTA CGG ATG ACC ACA GAG CGG ACC GTG GCC CGA CGG CTG CAG CTC 945
(amoa)Thr Thr Glu Ala Thr Val Ala Arg Pro Val Glu Leu
CAA CGT CAC CGG ACA TTC ACC TCG TTC ACG CCC CCC ACC CGA AAG 990
Glu Glu His Arg Thr Phe Thr Trp Phe Thr Pro Ala Arg Arg Lys

CGG ACC GAG TAC GAG CTC TAC ACC GTG CGT CAA CAG TCC ACT CGG 1035
Pro Thr Glu Tyr Glu Leu Tyr Thr Val Glu Glu Glu Ser Thr Pro
CAC GAG TCG CTC CAT GTG GAC TCG CGG CGC CCC TTC GAC GAC CGC 1080
Asp Glu Trp Leu His Val Asp Trp Pro Leu Arg Phe Asp Asp Glu
GGG CGC CGG TCG CAG GAG TCG AGT CGG GTA CGG ACC TCG CAG 1125
Arg Ala Pro Trp Glu Glu Ser Ser Ala Val Arg Thr Ser Glu
TCG TCG CCT TAC CGC CAC CCA CAC CAA CTG TCG CAG CGT CCC TAC 1170
Trp Ser Ala Tyr Arg Asp Pro His Glu Leu Trp Glu Arg Pro Tyr
GTC ACC ACC TCC AAC CAG GAC CAG CAG CCC CTC CGG CGG CTG GTC 1215
Val Ser Thr Cys Asn Glu Asp Glu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Val
CCC GTC CTC ACC ATG CGG TCG CGG CGG ATC ACC CGC ATC TCG TCG 1260
Pro Val Leu Thr Met Glu Ser Ala Ala Ile Thr Pro Ile Trp Ser
CAG AAG ATC CTC CGC ACC TCC TAC GCC CGC TCG CCA TTC GTC CAG 1305
Gln Lys Ile Leu Ala Arg Ser Tyr Ala Ala Trp Pro Phe Val Glu
TAC CGG CTC TTC CTG ACC CTG GCC TAC GCC GTG CGC CAG CGC ATG 1350
Tyr Glu Leu Phe Leu Ser Leu Ala Tyr Ala Val Arg Glu Ala Met
TCC GAC ACC GTC CAG TTC ACC CTG GTG TTC CAG CGC CTG GAC CGC 1395
Ser Asp Thr Val Glu Phe Ser Val Val Phe Glu Ala Val Asp Arg
ATG CGG CTC CTC CAG CAC ATC GTC CAC CAC CTG GAC CAC CTG CAG 1440
Met Arg Leu Leu Glu Asp Ile Val His His Leu Asp His Leu Glu
GAG TCG CGG GAA TTC ACC GAC CGC CGG CGC CGC GAG CGC TCG ATG 1485
Glu Ser Pro Glu Phe Ser Asp Ala Glu Ala Arg Glu Ala Trp Met
TCC GAC TCC ACC CTG GTC CGG ATC CGG GAA GTG ATC GAG CGC ATC 1530
Ser Asp Ser Thr Leu Val Pro Ile Arg Glu Val Ile Glu Arg Ile
GCC CGC ACC CAG CAC TCG GTC GAG ATC CTG GTC CGC CGC ACC CTC 1575
Ala Ala Ser Glu Asp Trp Val Glu Ile Leu Val Ala Glu Thr Leu
GTC TTC GAG CCT CTG GTC CGC CAC CTG CGG AAG CGC GAG TTG TTC 1620
Val Phe Glu Pro Leu Val Glu His Leu Ala Lys Ala Glu Leu Phe
AGC CGC CGT CGG CGG CCA ATG TTC CGG GAC CGG ACC CGG CGG CGG CTG 1665
Ser Arg Arg Ala Pro Met Phe Glu Asp Glu Thr Thr Pro Ala Val
CTG CGG TCG CGC CTG CTG GAC ACC CGC ACC CAC CTC GAA TCG GTC 1710
Leu Ala Ser Ala Leu Leu Asp Ser Glu Arg His Leu Glu Ser Val
CAG CGG CTC GTC CGC CTC GTC TCC CAA CAC CGC CGC CGC CAT CGC GAC 1755
Gln Ala Leu Val Arg Leu Val Cys Glu Asp Pro Val His Glu Asp
CAG AAC CAG CGG ACT GTG CGG CGG TCG ATC CAG GAA TCG CAG CGG 1800
Gln Asn Glu Ala Thr Val Arg Arg Trp Ile Glu Glu Trp Glu Pro
CGG TCG AAG CGG CGG CGC CGC CAG TCC TTC CTG CGG ACC TTC TCC GAC 1845
Arg Cys Lys Ala Ala Glu Glu Ser Phe Leu Pro Thr Phe Ser Asp

TGC CGC ATC GAC CGC AAG GAA ACC CGC AAC CGG CTG TCC CGG CGG 1890
Cys Glu Ile Asp Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Leu Ser Arg Ala
CTG CGC AAC CAG CGG CGC CGC GTC GAG CGC CGC CGC ATC ACC CGA 1935
Leu Ala Asn Glu Arg Ala Ala Val Glu Glu Ala Glu Ile Thr Ala

(amob)M

TG ACA GAC GTT AAG GAG ACC ACT GTG ACC ACC ACC CGC TCG CGC 1979

(11)

19

特開平8-70881

20

et Thr Asp Val Lys Glu Thr Thr Val Thr Ser Thr Pro Ser Ala
GCC GTG CCG CGA ACC AAG AAC AAC CCC CGC GTT CGT ATC TCG CTG ATC 2024
Ala Val Pro Gly Thr Lys Asn Arg Arg Val Gly Ile Ser Leu Ile
ACC ACC ACC GAC ACC CAG CGA CCT GTC GAC CAC ATC CGG GAG ACC 2069
Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ala Ala Val Glu His Ile Ala Glu Thr
CAG CGG GAC CGG AAG ATC GAC TTT CGG GAC TCC TTC TAC AAG ATC 2114
Gln Pro Asp Ala Lys Ile Asp Phe Arg Asp Cys Phe Tyr Lys Ile
GAG CGT GAC CGG CAG CTC AGT TTC GAC ATG CCA GAG CTC AGT GAC 2159
Glu Arg Asp Gly Gln Leu Ser Phe Asp Met Ala Glu Leu Ser Glu
ATC GCC CGT CGC GAC ATC GAC ACC GAC ATC TTC CTG GTG AAC ATC 2204
Ile Ala Gly Arg Asp Ile Asp Thr Asp Ile Asp Phe Leu Val Asn Met
ACC ACC TAC TAC CGC CGG ATC GTC GTC AGT GAC CGC CGG GTC GAC 2249
Ser Thr Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Val Ser Asp Gly Arg Val Asp

ATC TAC CGC GAA ATC CAG CGG CGC CGC TTC AAG GAC TGA GAG GAA 2294
Ile Tyr Ala Glu Ile Gln Pro Ala Arg Phe Lys Asp *
ACA CC ATG GCA TCG AAC CCC ACC CAG CTC CAC GAG AAG TCG AAG 2338
(amino) Met Ala Ser Asn Pro Thr Gln Leu His Glu Lys Ser Lys
TCC TAC GAC TCG GAC TTC AGC TCC GTC GAG CGG CGC CCC AAG TTC 2383
Ser Tyr Asp Trp Asp Phe Thr Ser Val Glu Arg Arg Pro Lys Phe
GAG ACC AAG TAC AAG ATG CGC AAG AAG GGC AAG GAC CGG TTC CGC 2428
Glu Thr Lys Tyr Lys Met Pro Lys Lys Gly Lys Asp Pro Phe Arg
GTC CTG ATC CGT GAC TAC ATG AAG ATG GAA CGG GAG AAG GAC GAC 2473
Val Leu Ile Arg Asp Tyr Met Lys Phe Glu Ala Glu Lys Asp Asp
CGG ACC CAT CGC TTC CTC GAC CGC CGC CGC CGG ACC CGT GAG CGC 2518
Arg Thr His Gly Phe Leu Asp Gly Ala Val Arg Thr Arg Glu Ala
ACC ACC ATT GAG CGG CGG TTC CCT GAG CGC ATG AAG ATC ATG CTG 2563
Thr Arg Ile Glu Pro Arg Phe Ala Glu Ala Met Lys Ile Met Val
CGG CAG CTG ACC AAC CGC GAG TAC CAG CGG CTG CGG CGC TCC CGA 2608
Pro Gln Leu Thr Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Val Ala Gly Cys Gly
ATG ATC ATC TCG CGC GTC GAG AAC CAG GAG CTC CGT CAG CGC TAC 2653
Met Ile Ile Ser Ala Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Gly Tyr
GCC CCT CAG ATG CTC CAT GAG CTG CGG CAC CGC CGG CTC GAG ATG 2698
Ala Ala Gln Met Leu Asp Glu Val Arg His Ala Gln Leu Glu Met

AGG CTA CGC AAC TAC TAC CGG AAG CAC TGG TGC GAT CCC TCC CGC 2743
Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ala Lys His Trp Cys Asp Pro Ser Gly
TTC GAC ATC CGT CAG CGC CGC CGC CTG TAC CAG CAC CCC CGG CGG CTG 2788
Phe Asp Ile Gly Gln Arg Gly Leu Tyr Gln His Pro Ala Gly Leu
CTG TCC ATC CGC GAG TTC CAG CAC TTC AAT ACT GGT GAC CGG CTT 2833
Val Ser Ile Gly Glu Phe Gln His Phe Asn Thr Gly Asp Pro Leu
GAC GTC ATC ATC GAT CTC AAC ATC CTG CGC GAG CGG CGG TTC ACC 2878
Asp Val Ile Ile Asp Leu Asn Ile Val Ala Glu Thr Ala Phe Thr
AAC ATC CTG CTG CTG CGC ACT CCA CAG GTC CGC CTG CGC AAC CGC 2923
Asn Ile Leu Leu Val Ala Thr Pro Gln Val Ala Val Ala Asn Gly
GAC AAC CGG ATG CGC ACC GTC TTC CTC TCG ATC CAG TCG GAC GAG 2968
Asp Asn Ala Met Ala Ser Val Phe Leu Ser Ile Gln Ser Asp Glu
GCC ACC CAC ATG CGC AAC CGG TAC CGC TCG GTC ATG CGG CTG CTG 3013
Ala Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gly Ser Val Met Ala Leu Leu

(11)

19

特開平8-70881

20

et Thr Asp Val Lys Glu Thr Thr Val Thr Ser Thr Pro Ser Ala
GCC GTG CCG GCA ACC AAG AAC CCC CGC GTT CGT ATC TCG CTG ATC 2024
Ala Val Pro Gly Thr Lys Asn Arg Arg Val Gly Ile Ser Leu Ile
ACC ACC ACC GAC ACC CAG GCA CCT GTC CAG CAC ATC CGG GAG ACC 2069
Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ala Ala Val Glu His Ile Ala Glu Thr
CAG CGG GAC CGG AAG ATC GAC TTT CGG GAC TCC TTC TAC AAG ATC 2114
Gln Pro Asp Ala Lys Ile Asp Phe Arg Asp Cys Phe Tyr Lys Ile
CAG CGT GAC CGG CAG CTC AGT TTC GAC ATG GCA GAG CTC ACT GAG 2159
Glu Arg Asp Gly Gln Leu Ser Phe Asp Met Ala Glu Leu Ser Glu
ATC GCC CGT CGC GAC ATC GAC ACC GAC ATC TTC CTG GTG AAC ATC 2204
Ile Ala Gly Arg Asp Ile Asp Thr Asp Ile Phe Leu Val Asn Met
ACC ACC TAC TAC CCC CGG ATC GTC GTC AGT GAC GGC CGG GTC GAC 2249
Ser Thr Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Val Ser Asp Gly Arg Val Asp

ATC TAC CCC GAA ATC CAG CGG CCC CCC TTC AAG GAC TGA GAG GAA 2294
Ile Tyr Ala Glu Ile Gln Pro Ala Arg Phe Lys Asp *
ACA CC ATG GCA TCG AAC CCC ACC CAG CTC CAC GAG AAG TCG AAG 2338
(amoC) Met Ala Ser Asn Pro Thr Gln Leu His Glu Lys Ser Lys
TCC TAC GAC TCG GAC TTC ACC TCC GTC GAG CGG CGC CCC AAG TTC 2383
Ser Tyr Asp Trp Asp Phe Thr Ser Val Glu Arg Arg Pro Lys Phe
CAG ACC AAG TAC AAG ATC CCC AAG AAG GGC AAG GAC CGG TTC CCC 2428
Glu Thr Lys Tyr Lys Met Pro Lys Lys Gly Lys Asp Pro Phe Arg
GTC CTG ATC CGT GAC TAC ATC AAG ATC GAA CGG GAG AAG GAC GAC 2473
Val Leu Ile Arg Asp Tyr Met Lys Phe Glu Ala Glu Lys Asp Asp
GGG ACC CAT GGC TTC CTC GAC CCC GGC GTG CGG ACC CGT GAG GGC 2518
Arg Thr His Gly Phe Leu Asp Gly Ala Val Arg Thr Arg Glu Ala
ACC AGG ATT GAG CGG CGG TTC CCT GAG CCC ATG AAG ATC ATG GTG 2563
Thr Arg Ile Glu Pro Arg Phe Ala Glu Ala Met Lys Ile Met Val
GGG CAG CTG ACC AAC CCC GAG TAC CAG CGG GTG CGG CCC TCC GCA 2608
Pro Gln Leu Thr Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Val Ala Gly Cys Gly
ATG ATC ATC TCG CCC GTC GAG AAC CAG GAG CTC CGT CAG GGC TAC 2653
Met Ile Ile Ser Ala Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Gly Tyr
CCC CCT CAG ATG CTC GAT GAG GTC CGG CAC CGG CAG CTC GAG ATC 2698
Ala Ala Gln Met Leu Asp Glu Val Arg His Ala Gln Leu Glu Met

AGG CTA CGC AAC TAC TAC CGG AAG CAC TCG TCC GAT CCC TCC CGC 2743
Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ala Lys His Trp Cys Asp Pro Ser Gly
TTC GAC ATC CGT CAG CCC GGC CTG TAC CAG CAC CCC CGG CGG CTG 2788
Phe Asp Ile Gly Gln Arg Gly Leu Tyr Gln His Pro Ala Gly Leu
GTG TCC ATC CCC GAG TTC CAG CAC ATC AAT ACT CGT GAC CGG CTT 2833
Val Ser Ile Gly Glu Phe Gln His Phe Asn Thr Gly Asp Pro Leu
GAC GTC ATC ATC GAT CTC AAC ATC GTG GCC GAG ACC CGG TTC ACC 2878
Asp Val Ile Ile Asp Leu Asn Ile Val Ala Glu Thr Ala Phe Thr
AAC ATC CTG CTG GTG CGC ACT CCA CAG GTC CGC CGC AAC CGG 2923
Asn Ile Leu Leu Val Ala Thr Pro Gln Val Ala Val Ala Asn Gly
GAC AAC CGG ATG CGC ACC GTC TTC CTC TCG ATC CAG TCG GAC GAG 2968
Asp Asn Ala Met Ala Ser Val Phe Leu Ser Ile Gln Ser Asp Glu
GCC ACC CAC ATG CGC AAC CGG TAC CGC TCG GTC ATG CGG CTG CTG 3013
Ala Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gly Ser Val Met Ala Leu Leu

(13)

特開平8-70881

23

24

TTC TTC TCG GCC GAC ACC TCG CCC GAG TTC CAG ACC GTC GTG CCC 4137
Phe Phe Ser Gly Asp Thr Ser Arg Glu Phe Gln Thr Val Val Gly
GGT GTC GAG TTT CTC ACG CGG GAC ATC CCC CGG GTC CGG CTC CGG 4182
Gly Val Glu Phe Leu Thr Ala Asp Ile Ala Arg Val Arg Leu Arg
CTA GAG CGG GCC GAG CAG ATC CCC TTC ACC CCC CGT CAG TTC GTC 4227
Leu Glu Pro Gly Glu Ile Ala Phe Thr Ala Gly Gln Phe Val
AAC GTC GAG GTG CGG CGC ACG CGT CTG CTG CGG ACC TTC TCG CTG 4272
Asn Val Clu Val Pro Gly Thr Gly Leu Leu Arg Thr Phe Ser Leu
GCA AAC CCC CCT GAC GAC CGG TCA GTG CTG CAG CTG ATC TCC AAC 4317
Ala Asn Ala Pro Asp Asp Pro Ser Val Val Glu Leu Ile Cys Lys
CTC TAC CGG GAT CCC CTC TTC TCC CGC TTC CTG AGG GAC GAG CCT 4362
Leu Tyr Pro Asp Gly Leu Phe Ser Arg Phe Leu Arg Asp Glu Ala
GCC CGG CGC ACC CGG GTC CGG TTC CGG CGG TAT CGT CAG CTC 4407
Ala Pro Gly Thr Pro Val Arg Val Phe Gly Pro Tyr Gly Gln Leu

AAG ATC CGC TTG TCC CAC CGG CGG ATC CTG ATG ATC CCC CGT CGG 4452
Lys Ile Arg Leu Ser His Arg Pro Ile Leu Met Ile Ala Gly Gly
TCC CGT CTC CGC CGG CTG CTC TCG ATG CTG CGA GAC TTG CGC CGC 4497
Ser Gly Leu Ala Pro Leu Leu Ser Met Leu Arg Asp Leu Ala Ala
AAG AAG TCC GAC CGG CGG GTC TCG ATG TTC TTC CGC CGA CGC ACC 4542
Lys Lys Cys Asp Arg Pro Val Ser Met Phe Phe Gly Ala Arg Ser
GTC GAC GAC CTG TAC CTC ATC GAG GAG ATC CGC GAG ATC CGC GAG 4587
Val Asp Asp Leu Tyr Leu Ile Glu Glu Ile Ala Glu Ile Gly Glu
TCG CTA CGC GAT TTC GAG ATC CCC CTG CTC TCG GAG TCG TCG 4632
Ser Leu Ala Asp Phe Glu Phe Ile Pro Val Leu Ser Glu Ser Ser
CCA CGC GAC TCG CAC CGC GAG ACC CGC ATG GTC ACC GAC CGC TTG 4677
Pro Ala Asp Trp His Gly Glu Thr Gly Met Val Thr Asp Ala Leu
CTG CGG TCG CGC CGG CGA CTG CGG CAT GAC GTC TAC CTG TCC CGG 4722
Leu Arg Trp Arg Ala Glu Leu Ala His Asp Val Tyr Leu Cys Gly
CGG CGA CGC ATG ATC GAC CGC CGT GTG CGG CTG CTC GTC GAG CGG 4767
Pro Pro Pro Met Ile Asp Ala Ala Val Pro Leu Leu Val Glu Arg
GCC GTG CGC CGA CGC AAC ATC TAC TAC GAC CGA TTC ACC CGA CCT 4812
Gly Val Arg Pro Arg Asn Ile Tyr Tyr Asp Ala Phe Thr Pro Ala
CGT CAG GCA GTC GTC TCA TCG TCC ATA TCC GAT TCG CGG CGC 4857
Ala Gln Val Val Val *

GCT ACC CGC CGG GTT AGG CGA CGG TAA TCG GGC CGG ATA GAG CGA 4902
GCC ACC AGA GAT GAT CGG CGT CGA AAG CGA ACC TTC GAC TCA GTT 4947
CAC ACC TTC CGC AAT GTG CTG TCC CGG CAC GAT AAC CGT GTG TTA 4992
CGG CGC CGG CTC AAT CGC ACC CGT CGC CTG ACC CGA ATC AAT TCA 5037
GCT ATG CCT GAT CAA TTG CGG CGA CGG TCG GTG TCG CGC ACC 5082
CAA ACC CGA ATT CAT TCA ATC GTC ATC TCG CCT TCG CGG CGG GAG 5127
TCG TTT TTG CAT CGG TTT TGA TCC CGG CGA CGC CGG CGA GAT 5172
GTT CGA TCG CGC CAT CAG CGG CGA CGA ATG CGG CGT CGA TCA ACC 5217
GGT CAT AGT CGC CGT CGA CGG CAT CGG GTG CGG CGT CCT GAG CGC 5262
CGG CGA ACC GAC ACT CGG TAA CGC CGT GAC CGC CGA ACA CGC CAT 5307
CGA GTC CGG CTT CGT TCG CGA CGT CGT ACC CCT TCC ATC CGC TCG 5352
GTT GTC GAG CGA ATA CCT CAG CGG CGA CGA CAT CGT ATA CGG ATT 5397
CAG GTG CGT AGT TGA TCT TCC CGG TGT CGA TGT GTG ACC CGC CGG 5442
ATC TCG CCT ACC AAC AAC ATC ACC AAC CGT GAC CTT CGG CGC ACA 5487

(14)

特開平8-70881

25

20

ACA TCG TCC CGT CGG CGA CGG GTG CGG ACC GTG ATC TCG CGG AAG 5532
TCC TCC CGG AGT TCG CGG CGC GGT TCC ACA CGG TTG CGG GTC CCT 5577
CGG CTA CAC CTC CGC CCT GTT CGT CAG CTC CGA CAT CAT CGG TCA 5622
CCC ACA CTC CTG CGC CCT GTT CGG CAA CAT CGT CGA CGA CGG CGA 5667
CGT GAA CCT TCG CCT CGT AGC ACA CGG AAT CGG CGA TCC CAA TCC 5712
GTT CCT CGA CCT CGT CGG CGT CAT CGC TGG CGT TGG CTG ACT AGG 5757
CGG CCT GTT CGT CGC CGC CGC AAC ATC CAG CGC GTG AGG AGT TGC 5802
GTA CGG GTC CGC CGG AAA CTC CAC GAC CGG CGC AAC CTC GTC CGG 5847
CTC AGC GAG TCG CGC CAC TGG GAT CTT CGC GAT GAC CGG ATC GAG 5892
CGC CTC CTT CGG CAC CGC AGC AAC TAT CTC CGT CGA GAT GTA CGC 5937
AGG CGG AAC CGA ATT CAC CGT GAT CGC CTT CGG CGC CGT CTC CTG 5982
CGC CAG CGT CTG TGT CCT TAT CTC TTG TGG ACC GAA CAC CGT GTG 6027
CGG TGG AGT TGG TGG GTT TGA TCA CGC CGG AAC CGG GAA TAG CAG 6072
CGC TTC CGC CTG ACC CGC CGC CGC CGA CAG CGC CGC CGC CGC GAC 6117
CGC CGC CGC CGG CGC CGC CAG CTC GAG CAG CAG ATG CAG CGC CAT 6162

CGG CGC CGC CGA CGC CGC GAC CGG GTG CGC CAT CGC GAT CGC CGC 6207
CGC GTT GAC GTT GAC GTT GTC CGG CGC GAT CTG CAG GTC CGG CAT 6252
CGA TTG AAT AGC GAC CGC CGC CGA TCC CTC GTT GAT CTC GTA CAG 6297
GTC CAC ATC CAT CGC CGA GAG TCC TTC CGG CGG CAG CGC CCT CGC 6342
CAT CGC GTT CGA CGG TTG CGA CAG CAG CGA CGG ATC C 6379

【図面の簡単な説明】

[図1] *E. coli* (大腸菌) JM109 (pDBB-1) 株 (FERM BP-4250) に保持されているプラスミドベクター pDBB1 の制限酵素地図及び *amoABCD* 遺伝子の組込み部位を示す。

【図2】 添加するトリクロロエチレンの量(液相濃度初期値)を種々に採り、Nocardiocorallina(ノカルディアコラリーナ) B-276 株(FERM BP-5124; ATCC 313 3038)を作用させた際、液相に残存するトリクロロエチレン濃度の経時的変化を比較する。

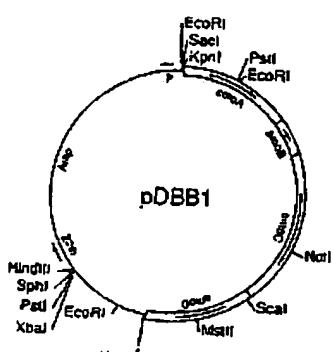
[図3] *Nucarpha corallina* (ノカルディアコラリ)

* ナー B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338)による
トリクロロエチレン処理速度のトリクロロエチレン添加
量依存性を示す。

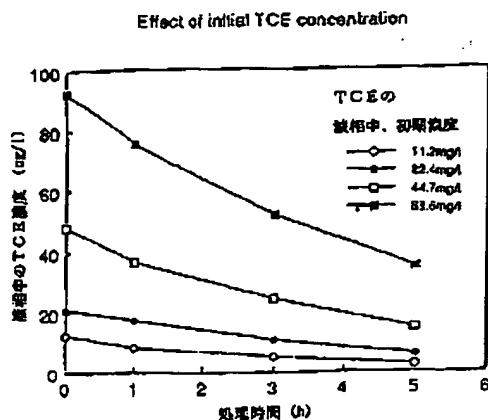
【図4】 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)によるトリクロロエチレン処理速度の温度依存性を示す

【図6】 Nocardia corallina (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)による処理における、各基質の残余量の経時的な変化を比較する。

[图1]



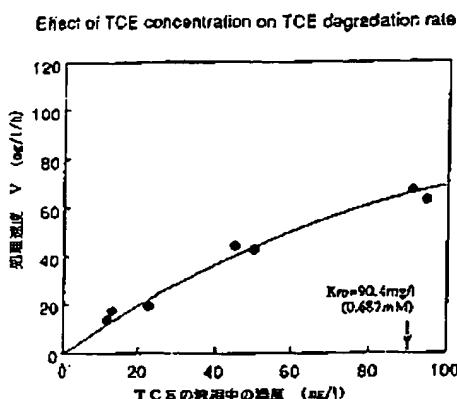
[图2]



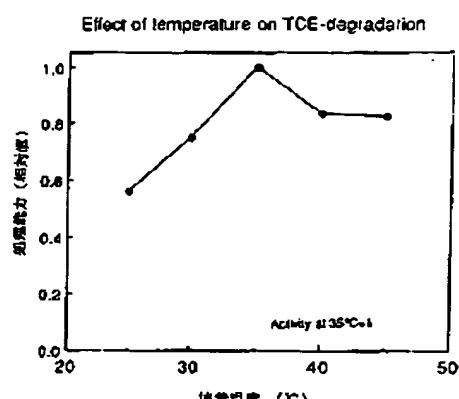
(15)

特開平8-70881

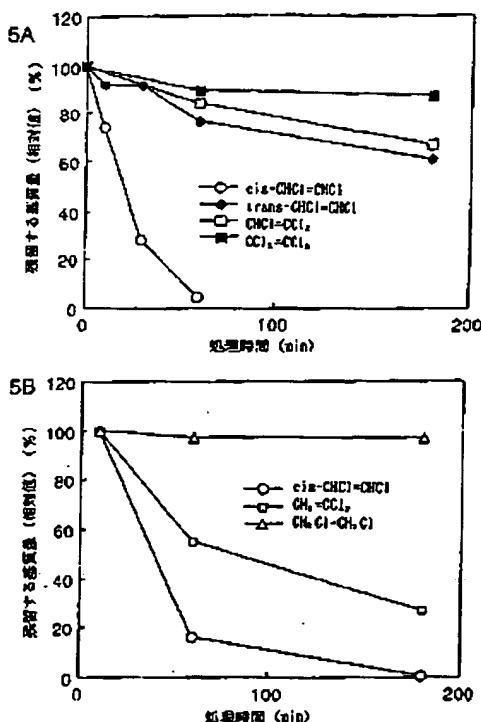
【図3】



【図4】



【図5】



(16)

特開平8-70881

フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	審別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
//(C 12 P 17/02				
C 12 R 1:365)				
(C 12 N 15/09	ZNA			
C 12 R 1:365)			C 12 R 1:365)	